

VU Research Portal

Function of Tomosyn-1 and -2 in the Mammalian Nervous System

Geerts, C.J.

2014

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Geerts, C. J. (2014). *Function of Tomosyn-1 and -2 in the Mammalian Nervous System*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Functie van tomosyn-1 en -2 in het zoogdier zenuwstelsel

Onze hersenen vormen een zeer complex orgaan dat miljarden zenuwcellen - neuronen - bevat die met elkaar communiceren door middel van elektrische signalen. Vanuit het cellichaam ontstaan meerdere uitlopers, neurieten, waarvan de meeste kort en sterk vertakt zijn. Dit zijn dendriten die signalen ontvangen van andere cellen. Elke cel heeft ook een lange uitloper, het axon, dat signalen over langere afstanden kan versturen naar verderop gelegen cellen. Dit is niet alleen nodig voor mentale processen, maar ook voor de controle van bewegingen, waarneming van prikkels en het op peil houden van de lichaamstemperatuur, bloeddruk en ademhaling.

In gespecialiseerde contactpunten tussen de verschillende cellen, zogenaamde synapsen, worden de elektrische signalen omgezet in chemische stoffen (neurotransmitters). Wanneer een presynaptische cel gestimuleerd wordt met een elektrisch signaal in de vorm van een actiepotentiaal, worden kanalen die hiervoor gevoelig zijn geopend en kunnen er calciumionen de cel binnen stromen. Eiwitten die actief worden door verhoogd calcium zorgen er vervolgens voor dat neurotransmitter bevattende blaasjes fuseren met het celmembraan. Hierbij laten ze hun inhoud vrij in de ruimte tussen cellen. Binding van deze neurotransmitter moleculen aan receptoren op een naburige cel zorgt ervoor dat ionenkanalen hier geopend worden. Een nieuw elektrisch signaal wordt gegenereerd door de ionenstroom die op gang komt in deze cel. Door veranderingen in de hoeveelheid neurotransmitter afgifte of de gevoeligheid van de postsynaptische cel kunnen elektrische signalen versterkt of juist verzwakt worden. Dit zijn vormen van synaptische plasticiteit.

Vergelijkbaar met de afgifte van neurotransmitter moleculen uit synaptische blaasjes (synaptic vesicles; SVs), kunnen neuropeptide eiwitten afgegeven worden door de fusie van grotere blaasjes met het celmembraan. Deze blaasjes hebben een dichtere kern wanneer ze bekeken worden met een elektronenmicroscop en heten daarom 'large dense-core vesicles' (LDCVs). Neuropeptiden spelen bijvoorbeeld een rol in het verfijnen en aanpassen van de verbindingen tussen zenuwcellen tijdens leer- en geheugen processen. Een derde type blaasjes in neuronen is de 'plasmalemmal precursor vesicle'. Deze blaasjes zorgen voor de aanvoer van celmembraan tijdens de uitgroei van neurieten.

De fusie van de verschillende soorten blaasjes wordt gereguleerd door een groep samenwerkende eiwitten. Dit proefschrift beschrijft onderzoek naar tomosyn, een eiwit dat de vorming van dit SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor (SNARE) eiwit complex remt. Het meeste van wat we tot nu toe weten over dit eiwit komt voort uit *in vitro* experimenten en onderzoek in eenvoudige modelorganismen.

Het zenuwstelsel van zoogdieren is echter veel complexer en brengt twee varianten van het eiwit tot expressie. Het doel van dit proefschrift was daarom om de rol van tomosyn-1 en tomosyn-2 in het zenuwstelsel van de muis te onderzoeken. In 'knockout' dieren is het gen dat codeert voor tomosyn-1 of tomosyn-2 verwijderd, waardoor het eiwit niet meer tot expressie komt. Door het gedrag van deze dieren en de *in vitro* synaptische werking, eiwit lokalisatie, interacterende eiwitten en neuriet uitgroei te analyseren, wilden we bepalen voor welke processen tomosyn essentieel is.

Zowel tomosyn-1 (hoofdstuk 2) en tomosyn-2 (hoofdstuk 3) bleken belangrijk te zijn voor embryonale ontwikkeling, aangezien er minder knockout dieren werden geboren dan je kunt verwachten volgens de wet van Mendel. In nesten met tomosyn-1 knockout dieren waren geen embryos te zien met opvallende afwijkingen, dus ging het waarschijnlijk al in de vroegste stadia van de ontwikkeling mis. Een deel van de tomosyn-2 knockout pups had vlak voor de geboorte opvallende bloedingen en degeneratie van het zenuwstelsel. De bloedingen zouden veroorzaakt kunnen worden door verminderde afgifte van het bloedstollingseiwit von Willebrandfactor. Verder zouden defecten tijdens de ontwikkeling te maken kunnen hebben met een rol van tomosyn in asymmetrische celdeling in oöcyten, endocrine regulatie van de groei van de foetus of in de ontwikkeling van het zenuwstelsel. In het ontwikkelende zenuwstelsel kan tomosyn betrokken zijn bij het aanleveren van celmembraan voor neuriet uitgroei en de regulatie van synaptische activiteit die connecties tussen zenuwcellen sterker of juist zwakker maakt. Neuriet uitgroei van gekweekte cellen uit zowel tomosyn-1 en tomosyn-2 knockout dieren was normaal, wat aangeeft dat beiden niet essentieel zijn voor dit proces.

Gekweekte neuronen zonder tomosyn-1 expressie hadden een verstoorde afgifte van neurotransmitters uit synaptische blaasjes. Dit was gecorreleerd met een verlaagde hoeveelheid Munc18 eiwit ten opzichte van normale ('wildtype') cellen. Dit eiwit is, in tegenstelling tot tomosyn, een positieve regulator van SNARE complex formatie. Gecontroleerde competitie tussen Munc18 en tomosyn zou dus kunnen zorgen voor een efficiënte regulatie van fuserende blaasjes. Interessant is dat tomosyn-2 knockout muizen een vergelijkbare neurotransmissie afwijking lieten zien in een synaps van een motor neuron op een spiercel, de neuromusculaire junctie (NMJ). Hierin was de frequentie van spontane fusie van individuele synaptische blaasjes verhoogd. Door middel van stimulatie, vergelijkbaar met een endogene actiepotential, kun je meerdere blaasjes tegelijkertijd aanzetten tot fusie met het celmembraan. Langdurige stimulatie leidde tot sterkere depressie van het postsynaptische signaal in tomosyn-2 knockout dieren. Op het niveau van het hele organisme was dit gecorreleerd met verslechterde motor coördinatie en spierzwakte. Ook vertoonden deze dieren verminderde prepuls inhibitie

van de akoestische schrikreflex, wat geassocieerd is met schizofrenie. Alles bij elkaar genomen lijkt het er op dat tomosyn betrokken is bij de ondersteuning van neurotransmitter afgifte tijdens verhoogde activiteit. Door het remmen van blaasjes-fusie in rust worden er mogelijk blaasjes achter de hand gehouden voor als de vraag toe neemt. Functionele verschillen tussen tomosyn-1 en tomosyn-2 zouden vooral kunnen ontstaan door ongelijke temporele expressie en expressie in verschillende celtypes.

Lokalisatie op de plekken waar fusie van blaasjes met het celmembraan plaats vindt is belangrijk voor de eiwitten die hierbij betrokken zijn. Aangezien neuronen zo veel en lange uitlopers hebben, worden de meeste van deze eiwitten efficiënt samen getransporteerd met behulp van speciale transport blaasjes. In hoofdstuk 4 laten we zien dat tomosyn zowel diffuus als in puncta tot expressie kwam in gekweekte neuronen. Deze puncta bewogen in de neurieten, bevatten naast tomosyn ook SV en LDCV eiwitten en zouden dus zulke transport blaasjes kunnen zijn. Ook leidt tomosyn de blaasjes mogelijk naar plekken met een hoge dichtheid aan SNARE eiwitten en voorkomt het wellicht fusie van blaasjes op plaatsen waar dit niet de bedoeling is. Tomosyn zelf kan niet aan membranen binden en heeft daarom waarschijnlijk een ander eiwit nodig voor de interactie met blaasjes. Het eiwit synaptotagmin-1 bleek niet essentieel te zijn voor lokalisatie van tomosyn op blaasjes. Andere kandidaat-eiwitten zullen in de toekomst getest gaan worden.

Hoofdstuk 5 beschrijft experimenten die aantoonen dat kleine SUMO-2/3 eiwitten kunnen binden aan tomosyn. Deze modificatie verandert of verfijnt mogelijk de functie van tomosyn op een bepaalde plek of moment. Waarschijnlijk is het eiwit PIASy betrokken bij het vastzetten van SUMO eiwitten op tomosyn, aangezien tomosyn in verschillende experimenten bleek te binden aan dit eiwit. Of en hoe dit betrokken zou kunnen zijn in bijvoorbeeld synaptische plasticiteit, evenals de mogelijke samenwerking met andere eiwitmodificaties, zal verder onderzocht moeten worden.

In hoofdstuk 6 ten slotte worden de belangrijkste bevindingen uit dit proefschrift besproken in relatie tot de huidige literatuur. Ook wordt er een bijgewerkt model voor de functie van tomosyn gegeven en wordt er stilgestaan bij vragen die nog openstaan voor toekomstig onderzoek. We stellen dat tomosyn betrokken is bij presynaptische plasticiteit door activiteitsafhankelijke regulatie van zijn remmende functie in de fusie van blaasjes met het celmembraan. Gezamenlijke effecten van eiwitmodificaties en Munc18 activiteit, waardoor beschikbaarheid en stoichiometrie van SNARE eiwit complexen beïnvloed kunnen worden, zijn mogelijk betrokken bij de functie van tomosyn. Vooral sterke synapsen met periodes van hoog verbruik, zoals de NMJ, zijn mogelijk afhankelijk van deze mechanismen. Naast neurotransmitter afgifte via synaptische blaasjes is tomosyn ook betrokken

bij de fusie van bijvoorbeeld LDCVs. (Activiteitsafhankelijke) regulatie van de remmende functie van tomosyn heeft waarschijnlijk andere implicaties voor dit soort blaasjes. Belangrijk ook is dat functionele redundantie tussen tomosyn-1 en tomosyn-2 mogelijk effecten maskeert in dieren die maar één van deze varianten missen. Toekomstige proeven zullen daarom gedaan worden in dieren die defect zijn voor zowel tomosyn-1 als tomosyn-2. Al met al zorgt het huidige en toekomstige onderzoek ervoor dat we de werking van het zenuwstelsel steeds beter begrijpen. Ook geeft het aanknopingspunten voor de defecten die optreden in patiënten met hersenaandoeningen, maar ook in andere ziekten waarbij stoffen betrokken zijn die worden uitgescheiden door middel van blaasjes, zoals diabetes en bloedstollingsziekten.